

PROCESS FOR THE PREPARATION OF 2-AMINO ACIDS

Patent Number: WO0208439
Publication date: 2002-01-31
Inventor(s): HAYAKAWA KOICHI (JP); KOBAYASHI YOICHI (JP)
Applicant(s): HAYAKAWA KOICHI (JP); NIPPON SODA CO (JP); KOBAYASHI YOICHI (JP)
Requested Patent: ☐ WO0208439
Application Number: WO2001JP06291 20010719
Priority Number(s): JP20000220066 20000721
IPC Classification: C12P13/04; C12P13/12; C12P13/04; C12R1/06; C12R1/01
EC Classification: C12P13/04, C12P41/00D
Equivalents:
Cited Documents: EP0450885; EP0332379; EP0187680; JP6319591; EP0356912; JP10042885; JP10042886

Abstract

A process for the preparation of 2-amino acids of the general formula [II]: $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ (wherein R is hydrogen, optionally substituted C1-6 alkyl, or the like), characterized by hydrolyzing a 2-aminonitrile of the general formula [I]: $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{CN}$ into a 2-amino acid of the general formula [II] in an aqueous solution containing a polybasic acid salt by the use of a biocatalyst exhibiting a nitrile-hydrolyzing activity.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 31 日 (31.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/08439 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 13/04, 13/12, 13/04, C12R 1/06, C12P 13/04, C12R 1/01, C12P 13/12, C12R 1/06, C12P 13/12, C12R 1/01
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/06291
- (22) 国際出願日: 2001 年 7 月 19 日 (19.07.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-220066 2000 年 7 月 21 日 (21.07.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本曹達株式会社 (NIPPON SODA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8165 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 洋一 (KOBAYASHI, Yoichi) [JP/JP]; 早川 公一 (HAYAKAWA, Koichi) [JP/JP]; 〒250-0280 神奈川県小田原市高田345 日本曹達株式会社 小田原研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 東海裕作, 外 (TOKAI, Yusaku et al.); 〒100-8165 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 日本曹達株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF 2-AMINO ACIDS

(54) 発明の名称: 2-アミノ酸の製造方法

(57) Abstract: A process for the preparation of 2-amino acids of the general formula [II]: $RCH(NH_2)COOH$ (wherein R is hydrogen, optionally substituted C_{1-6} alkyl, or the like), characterized by hydrolyzing a 2-aminonitrile of the general formula [I]: $RCH(NH_2)CN$ into a 2-amino acid of the general formula [II] in an aqueous solution containing a polybasic acid salt by the use of a biocatalyst exhibiting a nitrile-hydrolyzing activity.

(57) 要約:

本発明は、一般式 (I) : $RCH(NH_2)CN$ (式中、R は水素原子、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基等を示す。) で表わされる 2-アミノニトリルを多塩基酸塩を含む水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して、一般式 (II) : $RCH(NH_2)COOH$ で表わされる 2-アミノ酸に変換することを特徴とする一般式 [II] で表わされる 2-アミノ酸の製造方法である。

WO 02/08439 A1

明 細 書

2-アミノ酸の製造方法

技術分野：

本発明は2-アミノニトリルを原料として多塩基酸塩の存在下で生体触媒の作用により2-アミノ酸を製造する方法に関する。本発明により製造される2-アミノ酸は、農医薬用・食品用・飼料添加用などの用途があり広汎に利用される。

背景技術：

生体触媒のニトリル加水分解活性を用いた2-アミノ酸の製造方法としては、2-アミノニトリルを原料とする方法（特公昭58-15120号公報、特表昭63-500004号公報、特開平2-31694号公報、特表平3-500484号公報、特公平3-16118号公報）およびシアンヒドリンを原料とする方法（特開平9-140391号公報）が知られている。

2-アミノニトリルを原料とする場合は、2-アミノニトリルが一般に水溶液中で不安定で、アンモニアが遊離してシアンヒドリンに変化する性質があるため、収率良く2-アミノ酸を得るためには極めて活性の高い生体触媒を用いることが必要である。ところが既存の生体触媒では触媒活性が十分ではなく高収率で2-アミノ酸を得ることは困難であった。一方シアンヒドリンを原料として用いる方法では、アンモニアまたはアンモニウム塩の存在下でシアンヒドリンに生体触媒を作用させることにより収率は改善されることが知られていた（特開平9-140391号公報）ものの生産速度が遅く、アンモニウム塩の添加は実用的でないと言われていた。本発明の課題は、2-アミノニトリルを直接の原料として、生体触媒を用いて効率よく2-アミノ酸を製造する方法を提供することにある。

発明の開示：

本発明者らは生体触媒の2-アミノニトリルに対する加水分解活性を著しく向上させる活性化剤のスクリーニングの過程で、多塩基酸塩が有効であることを見出した。次いで、加水分解活性化における多塩基酸塩の適用濃度について検討したところ、意外にも生体触媒に対する活性向上効果は高濃度の多塩基酸塩で強く発現した。例えばリン酸水素二アンモニウム塩では飽和濃度に近い3 M濃度付

近で最大活性が得られた。一般に生体触媒はその本来の生理的な温度、pH及び塩濃度環境で最も効率的な触媒作用を有する場合が多いことからすると、3M濃度という極限環境の高塩濃度で最大活性が得られたことは驚嘆に値する。

さらに本発明者らは、高濃度の多塩基酸塩が生体触媒の有するシアンヒドリンに対する加水分解活性を阻害することを見出した。したがって、高濃度の多塩基酸塩を用いることにより、反応系中に混在するシアンヒドリンの加水分解が抑制され、シアンヒドリンからの副生成物である2-ヒドロキシ酸の生成が抑制され、ひいては2-アミノ酸の収量が向上する。このように、2-アミノニトリルに対する生体触媒活性が多塩基酸塩の存在下で著しく向上するにもかかわらず、同一の生体触媒をシアンヒドリンに対して作用させる場合は全く異なる性質を示すことは、通常予想し得ない現象である。

本発明は、2-アミノニトリルを直接の原料として生体触媒の作用により2-アミノ酸を製造する際に、多塩基酸塩を共存させることにより、極めて生産速度が高くかつ高収率で目的の2-アミノ酸を得ることができるという上記知見に基づいて完成に至ったものである。

すなわち本発明は、一般式[I]: $RCH(NH_2)CN$ (式中、Rは水素原子、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基、置換基を有しても良い $C_2 \sim C_6$ のアルケニル基、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルコキシル基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を有しても良いアリールオキシ基または置換基を有しても良い複素環基を示し、Rが置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基の場合、アミノ基とRが結合して環を形成してもよい。)で表わされる2-アミノニトリルを多塩基酸塩を含む水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して一般式[II]: $RCH(NH_2)COOH$ (式中、Rは前記と同一の意味を表わす。)で表わされる2-アミノ酸に変換することを特徴とする一般式[II]で表わされる2-アミノ酸の製造方法(請求項1)、置換基を有してもよい $C_1 \sim C_6$ のアルキル基が、 $C_1 \sim C_6$ のアルキルチオアルキル基又は $C_1 \sim C_6$ のヒドロキシアルキル基であることを特徴とする請求項1記載の一般式[II]で表わされる2-アミノ酸の製造方法(請求項2)、置換基を有してもよいアリール基が、フェニル基であることを特徴とする請求項1記載の一

一般式 [II] で表わされる 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 3)、2-アミノニトリルが 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルであることを特徴とする請求項 1 記載の 2-アミノ酸 [II] の製造方法 (請求項 4)、多塩基酸塩がリン酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、グルタミン酸塩又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項 1~4 のいずれかに記載の一般式 [II] で表わされる 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 5)、多塩基酸塩が多塩基酸のアンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項 1~5 のいずれかに記載の一般式 [II] で表わされる 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 6)、多塩基酸塩が、リン酸アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項 1~4 のいずれかに記載の一般式 [II] で表される 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 7)、多塩基酸塩の濃度が、1.5 M~飽和濃度であることを特徴とする請求項 7 に記載の一般式 [II] で表される 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 8)、多塩基酸塩が、クエン酸アンモニウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酒石酸アンモニウム、酒石酸ナトリウム、酒石酸カリウム、酒石酸ナトリウムカリウム、グルタミン酸アンモニウム、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項 1~4 のいずれかに記載の一般式 [II] で表される 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 9)、多塩基酸塩の濃度が、1.0 M~飽和濃度であることを特徴とする請求項 9 に記載の一般式 [II] で表される 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 10)、ニトリル加水分解活性を有する生体触媒がアースロバクター (*Arthrobacter*) 属又はバリオボラクス (*Variovorax*) 属に属する微生物菌体、該微生物の菌体処理物、該微生物の抽出物または該微生物から単離された酵素であることを特徴とする請求項 1~10 のいずれかに記載の一般式 [II] で表される 2-アミノ酸の製造方法 (請求項 11)、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属又はバリオボラクス (*Variovorax*) 属に属する微生物が、アースロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) NSSC104 若しくはアースロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) NSSC204 又はバリオボラクス パラドキシス (*Variovorax paradoxus*) IAM12374 である請求項 11 に記載の一般式 [II]

で表される 2-アミノ酸の製造方法（請求項 12）に関する。

本発明の一般式 (II) : $RCH(NH_2)COOH$ (式中、R は水素原子、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基、置換基を有しても良い $C_2 \sim C_6$ のアルケニル基、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルコキシル基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を有しても良いアリールオキシ基または置換基を有しても良い複素環基を示す。) で表わされる 2-アミノ酸の製造方法としては、一般式 (I) : $RCH(NH_2)CN$ (式中、R は水素原子、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基、置換基を有しても良い $C_2 \sim C_6$ のアルケニル基、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルコキシル基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を有しても良いアリールオキシ基または置換基を有しても良い複素環基を示す。) で表わされる 2-アミノニトリルを、多塩基酸塩を含む水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して一般式 (II) で表わされる 2-アミノ酸に変換する製造方法であれば特に制限されるものではない。

本発明で使用される生体触媒としては、多塩基酸塩を含む水溶液中でニトリルを加水分解する活性を有する微生物等の生体の触媒であれば特に制限されるものではなく、かかる生体としては例えばアースロバクター (Arthrobacter) 属、バリオボラクス (Variovorax) 属に属する微生物が挙げることができ、これらの中でも特に、アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) NSSC 104 (FERM BP-5829)、アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) NSSC 204 (FERM BP-7662) およびバリオボラクス パラドキシス (Variovorax paradoxus) IAM 12374 を好適に例示することができる。

アースロバクター NSSC 104 (FERM BP-5829) は独立行政法人産業技術総合研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に 1996 年 2 月 6 日付で寄託されており、その菌学的性質については WO 97/32030 に記載されている。

アースロバクター NSSC 204 (FERM BP-7662) も同様に、独立行政法人産業技術総合研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に 2000 年 6 月 22 日付で寄託されている。本菌株はアースロバクター NSSC 104 の変異処理により新たに分離されたものであり、その菌学的性質は以下の通りである。

形態	多形桿菌
グラム染色性	陽性
R o d - C o c c u s サイクル	有
芽胞	無
運動性	無
細胞壁のジアミノ酸	リジン
酸素に対する態度	好氣的
オキシダーゼ	—
カタラーゼ	+
DNAの分解	+
ゼラチンの液化	+
デンプンの分解	+
カゼインの分解	+
栄養要求性	無
グリコリル試験	—
キノン系	MK-9 (H ₂)

以上の菌学的性質をバーjeeズ マニュアル オブ システマティック バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (1986) に基づいて検索した結果、NSSC 204 株はアースロバクター (Arthrobacter) 属に属する新菌株と同定された。

また、バリオボラクス パラドキサス (Variovorax paradoxus) IAM 12374 は東京大学分子細胞生物研究所より容易に入手でき、その菌学的性質についてはインターナショナル ジャーナル オブ システマチック バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology) 第41巻、445～450 ページ (1991年) に記載されている。

また、これらの微生物の培養は、酵素誘導物質、微生物が資化しうる炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要ならば有機栄養源を含む通常の培地で行われる。

酵素誘導物質としては、イソブチロニトリル、2-アミノベンゾニトリル等のニトリル化合物、ε-カプロラクタムなどの環状アミド化合物等が使用され、特

に 2-アミノベンゾニトリルが好ましい。炭素源としてはグルコース等の炭水化物、エタノール等のアルコール類、有機酸その他が適宜用いられる。窒素源としては、アミノ酸、硝酸塩、アンモニウム塩その他が用いられる。無機イオンとしては、リン酸イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、硫酸イオン、鉄イオン、その他が必要に応じて使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸など及びこれらを含むコーンスチープリカー、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、その他が適宜用いられる。培養は好氣的条件下に、pH 6～9、温度 25～37℃の適当な範囲に制御しつつ行えばよい。

本発明に用いられる生体触媒としては、上記のように培養した菌体またはその菌体から調製した固定化菌体、粗酵素もしくは固定化酵素などの菌体処理物が挙げられる。菌体又は酵素を固定化する場合は担体結合法、包括法等の通常行われる固定化技術を適用できる。酵素または粗酵素を調製する場合は、菌体を超音波、高圧ホモジナイザー等によって破碎した後に、硫酸塩析、クロマトグラフィー等の通常行われる酵素精製技術が適用できる。また反応に用いた菌体等の生体触媒は実質的な活性低下なしに繰り返し加水分解反応に使用することができる。

本発明で用いられる一般式(I)において、Rは水素原子、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基、置換基を有しても良い $C_2 \sim C_6$ のアルケニル基、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルコキシ基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を有しても良いアリーロキシ基または置換基を有しても良い複素環基を表わし、該置換基としては、ヒドロキシ基、メルカプト基、アミノ基、シアノ基、カルバモイル基、置換基を有していてもよいフェニル基、イミダゾール基、インドール基、 $C_1 \sim C_6$ アルキルチオ基等を挙げることができる。

Rが置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基の場合、アミノ基とRが結合して環を形成してもよい。

置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基としては、 $C_1 \sim C_6$ のアルキルチオアルキル基又は $C_1 \sim C_6$ のヒドロキシアルキル基を、置換基を有しても良いアリール基としてはフェニル基を好適に例示することができる。

一般式(I)で表わされる2-アミノニトリルとしては、公知の2-アミノ酸に対応するニトリル化合物であれば特に制限なく使用できる。

具体的には、2-アミノ-アセトニトリル、2-アミノ-プロピオニトリル、2-アミノ-イソバレロニトリル、2-アミノ-3-ヒドロキシプロピオニトリル、2-アミノ-3-メチルバレロニトリル、2-アミノ-4-メチルバレロニトリル、2-アミノ-3-ヒドロキシブチロニトリル、2-アミノ-3-メルカプトプロピオニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノフェニルアセトニトリル、2-アミノ-3-フェニルプロピオニトリル、2-ピロリジンカルボニトリル等を挙げることができる。例えば2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを用いると、有用なアミノ酸であるメチオニンを得ることができる。

これらの2-アミノニトリルは0.01～50重量%の濃度で反応に使用され、必要ならば反応の間、逐次添加あるいは連続添加することができる。

本発明で使用される多塩基酸塩の酸基としては、リン酸、亜リン酸、二亜リン酸、二リン酸、炭酸、硫酸、亜硫酸、チオ硫酸、クエン酸、酒石酸、ブドウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、フタル酸、イタコン酸、シトラコン酸、シュウ酸、グルタル酸、アジピン酸、トリメト酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン酸等を挙げることができ、塩基性基としては、アンモニウム、アルキルアンモニウム、ピリジニウム等の有機塩基類、リチウム、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属等を挙げることができる。

これらの多塩基酸塩は、いずれも正塩、酸性塩またはそれらの混合物として2種類以上を組み合わせて使用できる。

これらの多塩基酸塩のうち、使用される生体触媒にとって有利なpH条件を反応時に設定することが容易であり、かつ比較的安価で水溶解度が高くなおかつ低毒性である点で、リン酸アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、クエン酸アンモニウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酒石酸アンモニウム、酒石酸ナトリウム、酒石酸カリウム、酒石酸ナトリウムカリウム、グルタミン酸アンモニウム、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム、硫酸マグネシウム又はそれらの混合物が好ましい。また、これらの多塩基酸塩は0.01 Mから飽和濃度の範囲で使

用できるが、酸基としてカルボン酸を有する多塩基酸塩においては 1.0M～飽和濃度、酸基として無機酸を有する多塩基酸塩においては 1.5M～飽和濃度で使用する事が2-アミノ酸の変換効率の点で好ましい。

本発明で使用する水溶液としては上記の多塩基酸塩を含むものであれば、他に無機塩、有機酸塩または有機溶媒を含んでいても良く、あるいは水と2相に分離しても良い。

本発明に用いられる生体触媒による加水分解反応は、水性溶媒中で上記の生体触媒を一般式 [I] で表わされる2-アミノニトリルに作用させることによって行われる。生体触媒は乾燥重量に換算して、通常0.001～10重量%の濃度で使用され、反応終了後は濾過、遠心分離又は限外濾過膜濃縮法によって回収して繰り返し加水分解反応に使用することもできる。また、加水分解反応における反応pHは、特に限定されるものではないが、適当な緩衝剤または酸もしくはアルカリによって5～12の間に保てばよい。反応の温度は4～80℃、好ましくは20～60℃に保てばよい。かかる加水分解反応により、用いた2-アミノニトリルに対応する2-アミノ酸が反応液中に生成される。

一般式 [II] で表わされる2-アミノ酸としては、例えば、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン、バリン、トリプトファン、チロシン、ノルロイシン、フェニルグリシンなどが挙げられる。これら2-アミノ酸は生体触媒の光学選択性によってD型、L型あるいはラセミ体のアミノ酸として得られる。生成された2-アミノ酸は、濾過、濃縮、抽出、イオン交換樹脂などの常法によって分離精製することができる。

発明を実施するための最良の形態：

実施例1 (NSSC104株によるDL-メチオニンの製造)

(NSSC104株の培養)

酵母エキス0.5%、グルコース0.5%、リン酸水素二カリウム0.1%、リン酸二水素カリウム0.1%、食塩0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.02%、硫酸第一鉄0.001%及びε-カプロラクタム0.5%を含む培地2ml

を試験管にとり121℃で20分間滅菌した。下記の組成の培地20mlを100ml容量のバッフル付き三角フラスコに入れた。アースロバクター (Arthrobacter) NSSC104株を前記の試験管に一白金耳植菌し、33℃で一晩振盪培養した後、その0.2mlを前記のバッフル付き三角フラスコに植え継ぎ、さらに4日間33℃で振盪培養した。

コーンスチープリカー	2.0%	(濾過滅菌)
スクロース	1.0%	(121℃で20分間滅菌)
ε-カプロラクタム	0.5%	(121℃で20分間滅菌)
pH	7.2	(2N苛性ソーダで調整)

(DL-メチオニンの生成)

得られたアースロバクター (Arthrobacter) NSSC104株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、20 OD_{630nm} となるようにイオン交換水に懸濁した。次いで9倍体積の3.33Mリン酸水素二アンモニウム水溶液 (pH 8.1) を加えて懸濁し、3.0Mリン酸水素二アンモニウム水溶液 (pH 8.1) とした。最後に2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度100mMになるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加6時間後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM、キャリア: エタノール/水/トリフルオロ酢酸=5/95/0.04) を用いて定量した結果、95mMのDL-メチオニンの蓄積を確認した。

実施例2 (NSSC204株によるDL-メチオニンの製造)

(NSSC204株の培養)

酵母エキス0.5%、グルコース0.5%、リン酸水素二カリウム0.1%、リン酸二水素カリウム0.1%、食塩0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.02%、硫酸第一鉄0.001%及び2-アミノベンゾニトリル0.03%を含む培地2mlを試験管にとり121℃で20分間滅菌した。下記の組成の培地20

ml を 100 ml 容量のバッフル付き三角フラスコに入れた。アースロバクター (Arthrobacter) N S S C 2 0 4 株を前記の試験管に一白金耳植菌し、33℃で一晩振盪培養した後、その 0.2 ml を前記のバッフル付き三角フラスコに植え継ぎ、さらに 4 日間 33℃で振盪培養した。

コーンステープリカー	2.0% (濾過滅菌)
スクロース	1.0% (121℃で20分間滅菌)
2-アミノベンゾニトリル	0.03% (121℃で20分間滅菌)
pH	7.2 (2N苛性ソーダで調整)

(DL-メチオニンの生成)

得られたアースロバクター (Arthrobacter) N S S C 2 0 4 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、20 OD_{630nm} となるようにイオン交換水に懸濁した。次いで9倍体積の2.22M亜リン酸アンモニウム水溶液 (pH 7.2) を加えて懸濁し、2.0M亜リン酸アンモニウム水溶液 (pH 7.2) とした。最後に2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度1.00 mMになるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加6時間後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80 TM、キャリア: エタノール/水/トリフルオロ酢酸 = 5/95/0.04) を用いて定量した結果、94 mMのDL-メチオニンの蓄積を確認した。

実施例3 (IAM12374株によるDL-メチオニンの製造)

(IAM12374株の培養)

0.3%肉汁、0.5%ペプトン及び0.5%食塩を含む培地2 mlを試験管に、下記の組成の培地20 mlを100 ml容量のバッフル付き三角フラスコに入れ、各々121℃で15分間滅菌した。パリオボラクス パラドキサス (Variovorax paradoxus) IAM12374株を前記の試験管に一白金耳植菌し、30℃で一晩振盪培養した後、その0.2 mlを前記のバッフル付き三角フラス

コに植え継ぎ、さらに5日間30℃で振盪培養した。

酵母エキス	0.5%
グリセロール	0.5%
リン酸一カリウム	0.1%
リン酸二カリウム	0.1%
食塩	0.02%
硫酸マグネシウム7水塩	0.02%
ϵ -カプロラクタム	0.5%
pH	7.2 (2N苛性ソーダで調整)

(DL-メチオニンの生成)

得られたバリオボラクス パラドキシス (*Variovorax paradoxus*) IAM 12374株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、 $60\text{ OD}_{630\text{nm}}$ となるようにイオン交換水に懸濁した。次いで7倍体積の3.33Mリン酸水素二アンモニウム水溶液及び2倍体積の3.33Mリン酸二水素アンモニウム水溶液を加えて懸濁し3.0Mリン酸水素二アンモニウム-リン酸二水素アンモニウム緩衝液 (pH 7.2) とした。最後に2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度50 mMになるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加10時間後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80 TM、キャリア: エタノール/水/トリフルオロ酢酸 = 5/95/0.04) を用いて定量した結果、49 mMのDL-メチオニンの蓄積を確認した。

実施例 4 (リン酸水素二アンモニウム濃度と DL-メチオニンの生成速度の関係)

実施例 1 によって得られたアースロバクター (Arthrobacter) N S S C 1 0 4 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体換算で 4 % (w/w) なるようにイオン交換水に懸濁した。次いで 9 倍体積の各種濃度のリン酸水素二アンモニウム水溶液 (pH 8. 1) を加えて懸濁して第 1 表に示した濃度のリン酸水素二アンモニウム水溶液とした。最後に 2-アミノ-4-メチルチオプロニトリルを終濃度 1 0 0 m M になるように添加し、3 5 °C で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 3 0 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム : T S K g e l O D S - 8 0 T M、キャリア : エタノール / 水 / トリフルオロ酢酸 = 5 / 9 5 / 0. 0 4) を用いて定量し、乾燥菌体 1 g 当たりの DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$) を計算した。結果を第 1 表に示す。第 1 表からリン酸水素二アンモニウム濃度が 1. 5 M 以上、特に 3. 0 M が DL-メチオニンの生成に好ましいことがわかる。

第 1 表

リン酸水素二アンモニウム濃度 (M)	DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)
0. 5	134
1. 0	134
1. 5	185
2. 0	256
2. 5	334
3. 0	446
3. 5	438
3. 8	321

実施例 5 (硫酸アンモニウム濃度と DL-メチオニンの生成速度の関係)

実施例 1 によって得られたアースロバクター (Arthrobacter) N S S C 1 0 4 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体に換算して 4%(w/w)なるように 0.5 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2)に懸濁した。次いで 9 倍体積の各種濃度の硫酸アンモニウム水溶液を加えて懸濁して第 2 表に示した濃度の硫酸アンモニウムを含む 0.05M リン酸カリウム緩衝液とした。最後に 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度 100 mM になるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80 TM、キャリア: エタノール/水/トリフルオロ酢酸=5/95/0.04) を用いて定量し、乾燥菌体 1 g 当たりの DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$) を計算した。結果を第 2 表に示す。第 2 表から硫酸アンモニウム濃度が 1.5 M 以上、特に 3.0 M が DL-メチオニンの生成に好ましいことがわかる。

第 2 表

硫酸アンモニウム濃度 (M)	DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)
0.5	214
1.0	215
1.5	252
2.0	265
3.0	286

実施例 6 (リン酸水素二アンモニウム濃度と 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の生成速度の関係)

実施例 1 によって得られたアースロバクター (Arthrobacter) N S S C 1 0 4 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体に換算して 4%(w/w) なるようにイオン交換水に懸濁した。次いで 9 倍体積の各種濃度のリン酸水素二アンモニウム水溶液 (pH 8.1) を加えて懸濁して第 3 表に示した濃度のリン酸水素二アンモニウム水溶液とした。最後に 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度 150mM になるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれる 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM、キャリア: エタノール/水/トリフルオロ酢酸 = 5/95/0.04) を用いて定量し、乾燥菌体 1g 当たりの 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$) を計算した。結果を第 3 表に示す。第 3 表から、リン酸水素二アンモニウム濃度が 3.0M の場合は 0.5M の場合に比べて、副生成物である 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の生成速度がおおよそ 1/17 に抑制されることがわかる。

第 3 表

リン酸水素二アンモニウム濃度 (M)	2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)
0.5	260
3.0	15

実施例 7 (NSSC204株によるフェニルグリシンの製造)

(フェニルグリシンの生成)

実施例 2 で得られたアースロバクター (Arthrobacter) NSSC204 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、 $0.8 OD_{630nm}$ となるようにイオン交換水に懸濁した。次いで 4 倍体積の 1.25M グルタミン酸モノナトリウム-0.125M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) を加えて懸濁し、1.0M グルタミン酸モノナトリウム-0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) とした。最後に 2-アミノフェニルアセトニトリルを終濃度 100 mM になるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 6 時間後に反応液を 2 倍体積のイオン交換水で希釈して生成物を溶解した後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるフェニルグリシンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM、キャリア: 10 mM リン酸二水素カリウム-15 mM リン酸-3 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0M アセトニトリル水溶液) を用いて定量した結果、31 mM のフェニルグリシンの蓄積を確認した。

実施例 8 (各種多塩基酸塩の濃度と DL-メチオニンの生成速度の関係)

実施例 2 によって得られたアースロバクター (Arthrobacter) NSSC204 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体換算で 0.4%(w/v) なるように第 4 表に示した濃度の各種多塩基酸塩を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。次いで 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度 2%(w/v) になるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM、キャリア: 10 mM リン酸二水素カリウム-15 mM リン酸-3 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0M アセトニトリル水溶液) を用いて定量し、乾燥菌体 1 g 当たりの DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$) を計算した。結果を第 4 表に示す。第 4 表から酸基としてカルボン酸を有する多塩基酸塩 (クエン酸三アンモニウム、クエン酸三ナトリウム、アスパラギン酸モノナトリウム、グルタミン酸モノナトリウム、マレイン酸ナトリウム、L-酒石酸ナト

リウムカリウム)では1.0M以上、酸基として無機酸を有する多塩基酸塩(リン酸水素二カリウム-リン酸二水素ナトリウム混合物、硫酸ナトリウム)では1.5M以上の濃度がDL-メチオニンの生成に好ましいことがわかる。

第4表

多塩基酸塩濃度とDL-メチオニン生成速度($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)の関係

多塩基酸塩濃度(M)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
多塩基酸塩						
クエン酸三アンモニウム	403	474	568	716	715	-
クエン酸三ナトリウム	403	475	588	741	720	-
L-アスパラギン酸モノナトリウム	403	486	602	635	-	-
L-グルタミン酸モノナトリウム	403	543	660	732	800	-
マレイン酸ナトリウム	403	494	607	780	-	-
L-酒石酸ナトリウムカリウム	403	587	752	765	743	-
$\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4(\text{pH}7.5)$	403	-	502	690	774	945
硫酸ナトリウム	403	-	506	761	805	842

実施例9 (多塩基酸塩の混合濃度とDL-メチオニンの生成速度及び副生成ヒドロキシ酸の生成速度の関係)

実施例2によって得られたアースロバクター(Arthrobacter) NSSC204株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体換算で0.4%(w/v)なるように第5表に示した濃度のクエン酸三アンモニウムとグルタミン酸モノナトリウムを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁した。次いで2

ーアミノー４ーメチルチオブチロニトリルを終濃度 2%(w/v)になるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニン及び 2ーヒドロキシー４ーメチルチオ酪酸の濃度を高速液体クロマトグラフィー（カラム：T S K g e l O D S - 8 0 T M、キャリア：10 mMリン酸二水素カリウムー15 mMリン酸ー3 mMヘキサンスルホン酸ナトリウムー2.0Mアセトニトリル水溶液）を用いて定量し、乾燥菌体 1 g 当たりの DL-メチオニン生成速度($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)及び 2ーヒドロキシー４ーメチルチオ酪酸生成速度($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)を計算した。結果を第 5 表に示す。第 5 表から 2 種類の多塩基酸塩を混合する場合においても、それぞれの有する 2ーアミノ酸生成活性向上効果及び副生物である 2ーヒドロキシ酸低減効果が相加的に表われることがわかる。すなわち、個々の塩の濃度が必ずしも最適濃度に至らない場合であっても、それらを 2 種類以上組合わせて使用することにより DL-メチオニンの生成に好ましい効果が表われることがわかる。

第 5 表

クエン酸三アンモニウム濃度 (M)	1.0	0.5	0
グルタミン酸モノナトリウム濃 (M)	0	0.5	1.0
DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)	568	615	660
2ーヒドロキシー４ーメチルチオ酪酸 生成速度($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)	36	20	12

クエン酸三アンモニウム濃度 (M)	1.5	1.0	0.5	0
グルタミン酸モノナトリウム濃 (M)	0	0.5	1.0	1.5
DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)	716	689	689	732
2ーヒドロキシー４ーメチルチオ酪酸 生成速度($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)	21	14	11	7

第5表 (つづき)

クエン酸三アンモニウム濃度 (M)	2.0	1.5	1.0	0.5	0
グルタミン酸モノナトリウム濃 (M)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
DL-メチオニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)	715	797	765	773	800
2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸 生成速度($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)	12	10	8	7	5

実施例10 (リン酸水素二アンモニウム濃度と DL-アラニンの生成速度の関係)

実施例2によって得られたアースロバクター (Arthrobacter) N S S C 2 0 4 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体換算で 0.2%(w/v) なるように第6表に示した濃度のリン酸水素二アンモニウム (pH8) に懸濁した。次いで2-アミノプロピオニトリルを終濃度 2%(w/v) になるように添加し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれる DL-アラニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM、キャリア: 10mMリン酸二水素カリウム-15mMリン酸-3mMヘプタンスルホン酸ナトリウム-2.0Mアセトニトリル水溶液) を用いて定量し、乾燥菌体 1g 当たりの DL-アラニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$) を計算した。結果を第6表に示す。第6表からリン酸水素二アンモニウム濃度が 1.5M 以上、特に 3.0M が DL-アラニンの生成に好ましいことがわかる。

第6表

リン酸水素二アンモニウム濃度 (M)	DL-アラニン生成速度 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$)
0.5	760
1.0	800
1.5	1100
2.0	1500
2.5	1750
3.0	1970
3.5	1820

産業上の利用可能性：

本発明によれば、2-アミノニトリルを直接の原料としてニトリル加水分解活性を有する生体触媒を多塩基酸塩の存在下で用いることにより、2-ヒドロキシ酸の副成による収率低下を招くことなく高い生産速度で目的の2-アミノ酸を得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. 一般式[I]: $RCH(NH_2)CN$ (式中、Rは水素原子、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基、置換基を有しても良い $C_2 \sim C_6$ のアルケニル基、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルコキシル基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を有しても良いアリールオキシ基または置換基を有しても良い複素環基を示し、Rが置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基の場合、アミノ基とRが結合して環を形成してもよい。) で表わされる2-アミノニトリルを多塩基酸塩を含む水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して、一般式[II]: $RCH(NH_2)COOH$ (式中、Rは前記と同一の意味を表わす。) で表わされる2-アミノ酸に変換することを特徴とする一般式[II]で表わされる2-アミノ酸の製造方法
2. 置換基を有してもよい $C_1 \sim C_6$ のアルキル基が、 $C_1 \sim C_6$ のアルキルチオアルキル基又は $C_1 \sim C_6$ のヒドロキシアルキル基であることを特徴とする請求項1記載の一般式[II]で表わされる2-アミノ酸の製造方法
3. 置換基を有してもよいアリール基が、フェニル基であることを特徴とする請求項1記載の一般式[II]で表わされる2-アミノ酸の製造方法
4. 2-アミノニトリルが2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルであることを特徴とする請求項1記載の2-アミノ酸[II]の製造方法
5. 多塩基酸塩がリン酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、グルタミン酸塩又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の一般式[II]で表わされる2-アミノ酸の製造方法
6. 多塩基酸塩が多塩基酸のアンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の一般式[II]で表わされる2-アミノ酸の製造方法
7. 多塩基酸塩が、リン酸アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム又はそれらの混合物であるこ

とを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の一般式(II)で表される 2-アミノ酸の製造方法

8. 多塩基酸塩の濃度が、1.5 M～飽和濃度であることを特徴とする請求項 7 に記載の一般式(II)で表される 2-アミノ酸の製造方法

9. 多塩基酸塩が、クエン酸アンモニウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酒石酸アンモニウム、酒石酸ナトリウム、酒石酸カリウム、酒石酸ナトリウムカリウム、グルタミン酸アンモニウム、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の一般式(II)で表される 2-アミノ酸の製造方法

10. 多塩基酸塩の濃度が、1.0 M～飽和濃度であることを特徴とする請求項 9 に記載の一般式(II)で表される 2-アミノ酸の製造方法

11. ニトリル加水分解活性を有する生体触媒がアースロバクター (*Arthrobacter*) 属又はバリオボラクス (*Variovorax*) 属に属する微生物菌体、該微生物の菌体処理物、該微生物の抽出物又は該微生物から単離された酵素であることを特徴とする請求項 1～10 のいずれかに記載の一般式(II)で表される 2-アミノ酸の製造方法

12. アースロバクター (*Arthrobacter*) 属又はバリオボラクス (*Variovorax*) 属に属する微生物が、アースロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) N S S C 1 0 4 若しくはアースロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) N S S C 2 0 4 又はバリオボラクス パラドキシサス (*Variovorax paradoxus*) I A M 1 2 3 7 4 であることを特徴とする請求項 11 に記載の一般式(II)で表される 2-アミノ酸の製造方法